

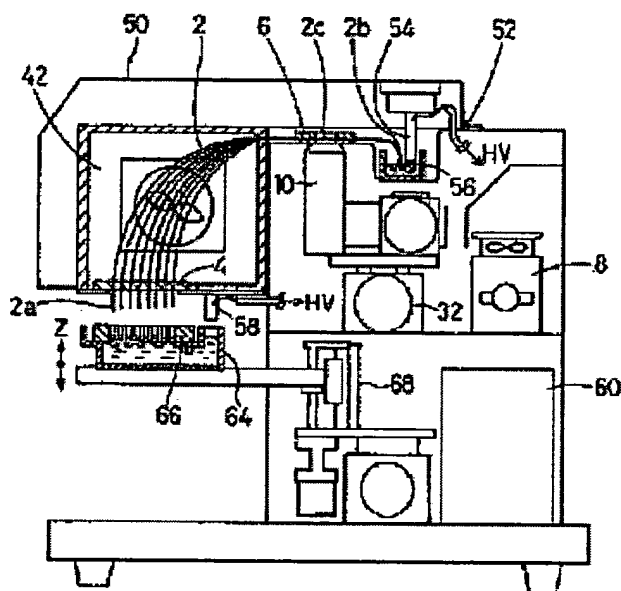
# MULTICAPILLARY ELECTROPHORETIC DEVICE

**Patent number:** JP10206384  
**Publication date:** 1998-08-07  
**Inventor:** HAYASHIZAKI YOSHIHIDE; NAKAMURA SHIN  
**Applicant:** KAGAKU GIJUTSU SHINKO JIGYODAN;; RIKAGAKU KENKYUSHO;; SHIMADZU CORP  
**Classification:**  
- international: G01N27/447  
- european:  
**Application number:** JP19970019968 19970116  
**Priority number(s):**

## Abstract of JP10206384

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To enhance processing capacity by increasing the number of capillaries detectable by simultaneously electrophoresing them while holding reliability.

**SOLUTION:** After a sample stage 68 moves/contacts a sample tighter plate 66 to/with the capillary array end 2a, high voltage is impressed for a prescribed time between both electrodes 54 and 58, and a sample is injected. Afterwards, an electrophoretic reservoir 64 contacts with the capillary array end 2a, and electrophoresis is started. When an electrophoretically separated DN fraction passes through a detecting object part 2c, an exciting-light receiving optical system 10 is scanned, and fluorescence from four kinds of fluorescent materials labelling the sample is detected by a photomultiplier. The exciting-light receiving optical system 10 is scanned at high speed by having a falling radiation optical system and a confocal optical system.





US006120667A

**United States Patent** [19]**Hayashizaki et al.**[11] **Patent Number:** **6,120,667**[45] **Date of Patent:** **Sep. 19, 2000**[54] **MULTI-CAPILLARY ELECTROPHORESIS APPARATUS**[75] **Inventors:** Yoshihide Hayashizaki, Ibaraki; Shin Nakamura; Katsuya Kashiwagi, both of Kyoto, all of Japan[73] **Assignees:** Japan Science and Technology Corporation, Kawaguchi; The Institute of Physical and Chemical Research, Wako; Shimadzu Corporation, Kyoto, all of Japan[21] **Appl. No.:** 09/006,933[22] **Filed:** Jan. 14, 1998[30] **Foreign Application Priority Data**

Jan. 16, 1997	[JP]	Japan	9-019968
Jan. 16, 1997	[JP]	Japan	9-019969

[51] **Int. Cl.<sup>7</sup>** ..... G01N 27/26[52] **U.S. Cl.** ..... 204/603; 356/344[58] **Field of Search** ..... 204/452, 603, 204/461, 612; 356/344; 382/128, 129[56] **References Cited****U.S. PATENT DOCUMENTS**

4,592,089	5/1986	Hartman	382/6
5,221,448	6/1993	Weinberger et al.	204/180.1
5,534,703	7/1996	Kambara et al.	250/458.1

5,538,613	7/1996	Brumley et al.	204/612
5,582,705	12/1996	Yeung et al.	204/603
5,885,430	3/1999	Kernan et al.	204/453

**FOREIGN PATENT DOCUMENTS**

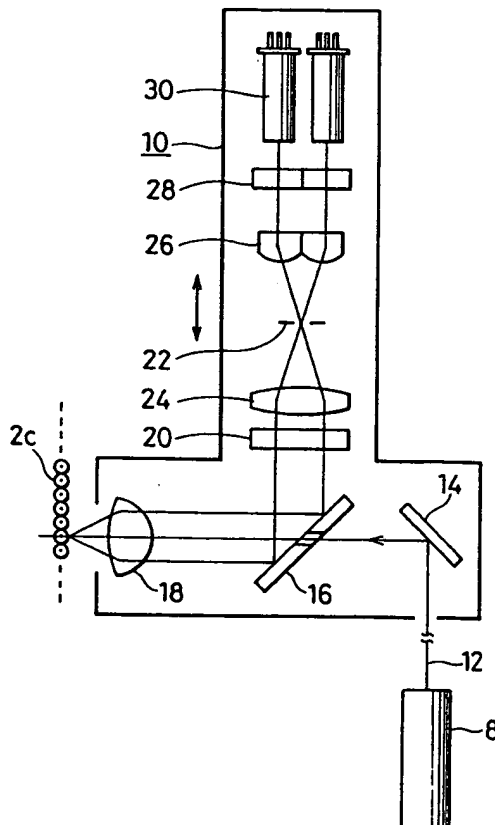
9317325 9/1993 WIPO.

**OTHER PUBLICATIONS**

WPIDS abstract of Hitachi LTD (JP 05196602 A), Aug. 1993.

*Primary Examiner*—Jill Warden*Assistant Examiner*—Alex Noguerola*Attorney, Agent, or Firm*—Armstrong, Westerman, Hattori, McLeland & Naughton[57] **ABSTRACT**

After a sample stage moves and brings a sample titer plate toward and into contact with a capillary array end, a high voltage is applied across electrodes for a prescribed time for injecting samples. Thereafter an electrophoresis reservoir comes into contact with the capillary array end, for starting electrophoresis. When electrophoresed/separated DNA fragments pass through a detection part, an excitation/photoreceiving optical system is scanned so that photomultipliers detect fluorescence from four types of fluorescent materials labeling the samples. The excitation/photoreceiving optical system comprises an epi-optical system and a confocal optical system, and is scanned at a high speed.

**11 Claims, 10 Drawing Sheets**

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-206384

(43)公開日 平成10年(1998) 8月7日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

G 0 1 N 27/447

識別記号

F I

G 0 1 N 27/26

3 1 5 K

3 2 5 B

審査請求 未請求 請求項の数5 F D (全 10 頁)

(21)出願番号 特願平9-19968

(22)出願日 平成9年(1997) 1月16日

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(71)出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(71)出願人 000001993

株式会社島津製作所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

(74)代理人 弁理士 野口 繁雄

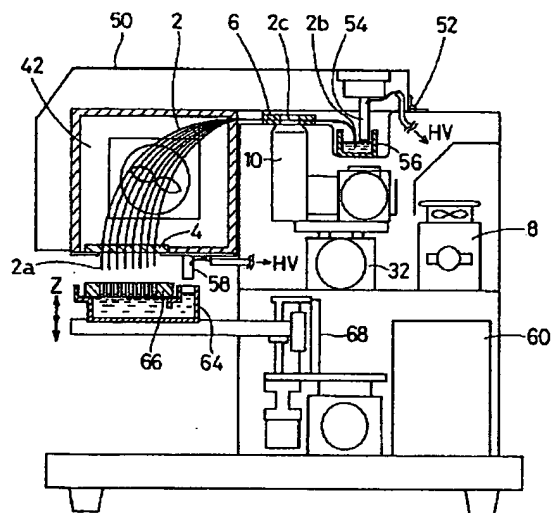
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マルチキャピラリー電気泳動装置

(57)【要約】

【課題】 信頼性を保ちつつ、同時に泳動させて検出できるキャピラリーの本数をより多くして処理能力を高める。

【解決手段】 サンプルステージ68がサンプルタイタープレート66をキャピラリーアレイ端2aに移動させ接触させた後、両電極54、58間に高圧が所定時間印加されて試料の注入が行なわれる。その後、泳動用リザーバ62がキャピラリーアレイ端2aに接触し、泳動が開始される。泳動分離されたDN断片が被検出部2cを通過する際、励起・受光光学系10が走査されて試料を標識している4種類の蛍光物質からの蛍光が光電子増倍管で検出される。励起・受光光学系10は落射光学系と共焦点光学系を備えて高速に走査される。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ゲルが充填された複数のキャピラリーカラムが配列され、4種類の蛍光物質により識別可能に標識された4種類の末端塩基の異なるDNAフラグメントを含む複数の試料が1つずつ前記キャピラリーカラムに注入されて、全てのキャピラリーカラムで同時に電気泳動されるマルチキャピラリーアレイ泳動部と、前記マルチキャピラリーアレイ泳動部のキャピラリーアレイの面に対し、その垂直方向から泳動方向と直交する直線上に励起光を照射し、励起光により励起された試料からの蛍光を受光し、その蛍光の波長特性を検出する励起・受光光学系とを備えたマルチキャピラリー電気泳動装置において、

前記マルチキャピラリーアレイ泳動部は、一端側が試料注入側となってキャピラリーカラム端が2次的に配列されてバッファ液に浸され、他端が別のバッファ液に浸されるとともに、両バッファ液間を通して泳動電圧が印加されるようになっており、かつ他端側にキャピラリーカラムが1列に配列された被検出部を備えており、

前記励起・受光光学系は、励起光をキャピラリーアレイの前記被検出部の1本のキャピラリーカラムに集光光学系により投光するとともにキャピラリーカラム内を泳動する試料から発生する蛍光を同じ集光光学系により受光する落射光学系と、キャピラリーカラム内を泳動する試料から発生する蛍光をその落射光学系とともに結像する共焦点光学系と、その共焦点光学系による蛍光像からの蛍光を4種類の標識蛍光物質のそれぞれに対応する波長ごとに空間的に4つに分割する分割・分光光学系と、その4分割された蛍光をそれぞれ検出する光電子増倍管又はアバランシェ・フォトダイオードからなる光検出器とを備えており、

キャピラリーアレイの前記被検出部で全てのキャピラリーカラムからの蛍光を検出するために、前記励起・受光光学系を前記被検出部でのキャピラリーアレイの面に平行で泳動方向と直交する1直線に沿って往復方向に移動させる走査機構を備えていることを特徴とするマルチキャピラリー電気泳動装置。

【請求項2】 前記励起・受光光学系の分割・分光光学系は、共焦点光学系による蛍光像からの蛍光を4つの光束に分割するレンズ系と、分割された光束のそれぞれの光路上に配置された各標識蛍光物質用の異なる4つの蛍光用分光フィルターとを備えている請求項1に記載のマルチキャピラリー電気泳動装置。

【請求項3】 前記励起・受光光学系の分割・分光光学系は、共焦点光学系による蛍光像からの蛍光を分光する分散素子と、その分散素子により分光された標識蛍光物質のそれぞれに対応する4つの波長の蛍光を前記光検出器のそれぞれに導く光学系とを備えている請求項1に記載のマルチキャピラリー電気泳動装置。

【請求項4】 前記マルチキャピラリーアレイ泳動部の

試料注入側では2次的に配列されたキャピラリーカラム端が下向きに固定され、そのキャピラリーカラム端の下方にはそのキャピラリーカラム端の配列と対応して、試料が収容された試料容器が2次的に配列されて各キャピラリーカラムに電圧が印加される試料注入用リザーバ、及び泳動用バッファ液が収容されて全キャピラリーカラムに電圧が印加される泳動用リザーバが配置され、両リザーバのいずれかを前記キャピラリーカラム端の下方に位置決めするための水平方向の移動と、リザーバをキャピラリーカラム端方向に接近させたり引き離したりするための垂直方向の移動とを行なうリザーバ移動機構を備えている請求項1、2又は3に記載のマルチキャピラリー電気泳動装置。

【請求項5】 前記マルチキャピラリーアレイ泳動部のマルチキャピラリーアレイを収容するチャンパーと、そのチャンパーを一定温度に保つ温調機構とをさらに備えている請求項1、2、3又は4に記載のマルチキャピラリー電気泳動装置。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はサンガー反応を用い、プライマー又はターミネータを蛍光物質で標識したDNAフラグメント（断片）試料を電気泳動させ、泳動途中でDNAフラグメント試料からの蛍光を検出して塩基配列を決定するオンライン式の電気泳動装置に関するものである。特に、本発明は泳動ゲルを充填した複数のキャピラリーカラムを用いて複数の試料を同時に電気泳動させるマルチキャピラリーDNAシーケンサの電気泳動装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】人ゲノムのような長大な塩基配列をもつDNAの塩基配列決定には、高感度で、高速で、かつ大処理能力をもったDNAシーケンサが必要となる。その1つの方法として、平板状のスラブゲルを用いたものに代わってゲルを充填したキャピラリーカラムを複数本配列したマルチキャピラリーDNAシーケンサが提案されている。キャピラリーカラムは、スラブゲルに比べて、試料の取扱いや注入が容易であるだけでなく、高速に泳動させて高感度で検出できる。つまり、スラブゲルで高電圧を印加すれば、ジュール熱の影響によりバンドが広がったり、温度勾配が生じるなどの問題が生じるが、キャピラリーカラムではそのような問題は少なく、高電圧を印加して高速泳動をさせても、バンドの広がりが少なく高感度検出ができるのである。

【0003】サンガー法によって処理すれば、その末端がA（アデニン）、G（グアニン）、T（チミン）、C（シトシン）からなる4種類のDNAフラグメント試料が生成される。処理能力を上げるためには複数のキャピラリーカラムで同時に電気泳動させる必要があるが、その場合、末端塩基別の試料を異なるキャピラリーカラム

で泳動させると、キャピラリーカラム間の泳動速度の差が塩基配列決定の誤差となる。そのため、各キャピラリーカラムには4種類の末端塩基のDNAフラグメントを含んだ試料を注入し、複数のキャピラリーカラムで同時に泳動させなければならない。その際、末端塩基の異なる4種類のDNAフラグメントを識別するために、2種類以上の蛍光物質で標識することが行なわれている。

【0004】末端塩基の異なるDNAフラグメントを識別するための標識物質としてFAM、JOE、TAMRA及びROXの4種類の発蛍光団をそれぞれ異なるDNAフラグメントに標識として用いる方法(Anal. Chem. 1994, 66, 1021-1026(引用例1)参照)や、FAMとJOEの2種類を比率を異ならせて用いることによりコード化して4種類のDNAフラグメントを識別する方法(Anal. Chem. 1992, 64, 2149-2154(引用例2)参照)が提案されている。いずれにしても、マルチキャピラリーDNAシーケンサの処理能力を上げるためには、多色蛍光標識によって識別できるようにした末端塩基の異なる4種類のDNAフラグメントを含む試料を各キャピラリーカラムに注入し、複数のキャピラリーカラムで複数の試料を同時に泳動させることが背景となっている。

【0005】複数のキャピラリーカラムで同時に泳動させ、試料から発生する蛍光を検出する光学系の一例は、キャピラリーカラムの配列の側面側から励起光ビームを入射し、キャピラリーカラム配列の垂直方向からCCD(電荷結合素子)カメラで蛍光を検出するものである(引用例1参照)。そこでは、キャピラリーカラム表面での散乱に基づくバックグラウンド信号を除去するために、励起光を入射する位置では泳動されてきた試料がキャピラリーカラムを出てシースフローとなるようにしている。引用例1の方法では、シースフローを形成しているので、ビーム強度の減衰は少ないが、シースフロー状態にするためのキャピラリーカラムのセッティングが難しく、マルチ化しにくい問題がある。

【0006】他の例は、励起光が1本のキャピラリーカラムを照射するように励起光学系で集光し、キャピラリーカラム中の試料からの蛍光を受光光学系で検出する。励起光学系と受光光学系はともに固定しておいて、キャピラリーカラムが励起光を横切るようにキャピラリーカラムの配列を走査することによって、複数のキャピラリーカラム中の試料からの蛍光を順次検出するものである(引用例2参照)。引用例2の方法では、キャピラリーアレイを機械的に動かして走査するため、キャピラリーカラムがよじれ、マルチ化の本数に制約を受けやすい。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】これらの提案された方法では、同時に泳動を行なうキャピラリーカラムの本数に限界があり、一度に分析できる試料の数に制約を受け、処理能力の点でなお改良の余地がある。キャピラリーアレイからの蛍光をCCDやCID(電荷注入装置)

の撮像素子で検出する場合には、撮像素子の画素数の制約もあって検出できるキャピラリーカラム本数に制限がある。またCCDやCIDの撮像素子は光電子増倍管に比べて感度も低い。標識を2種類の蛍光物質で行ないその比率を異ならせる方法では、2色の信号強度比によって塩基の種類を識別しなければならず、信頼性に問題がある。

【0008】多数のキャピラリーカラムを用いた場合、それぞれに異なる試料を注入するのが容易ではない。また、キャピラリーカラム端を試料注入用容器の試料に浸し電圧を印加する方法などにより注入した後、そのキャピラリーカラム端を泳動用のバッファ液の入ったリザーバに移し換えなければならない、試料注入から泳動開始に至るまでに手間がかかり、自動化ができれば好都合である。

【0009】キャピラリー電気泳動装置では、1本のキャピラリーカラムのみを用いた装置ではキャピラリーカラムの温度を一定に保つようにしたものはあるが、マルチキャピラリー電気泳動装置では温度を一定に保っているものはない。そのため、泳動時の温度変化によって泳動速度がばらついたり、検出される塩基の間隔が変動(コンプレッション)するなどして、塩基配列決定の誤差となる。

【0010】本発明の第1の目的は、信頼性を保ちつつ、同時に泳動させて検出できるキャピラリーの本数をより多くして処理能力を高めることである。本発明の第2の目的は、多数のキャピラリーカラムへの試料注入から泳動までを自動化することである。本発明の第3の目的は、泳動中の温度変化による塩基配列決定誤差を防ぐことである。

【0011】

【課題を解決するための手段】信頼性を保ちつつ、同時に泳動させて検出できるキャピラリーカラムの本数をより多くするために、本発明では4種類の末端塩基の異なるDNAフラグメントを4種類の蛍光物質を用いてそれぞれ異なる蛍光物質で標識する。そして、マルチキャピラリーアレイ泳動部は、一端側が試料注入側となってキャピラリーカラム端が2次的に配列されてバッファ液に浸され、他端が別のバッファ液に浸されるとともに、両バッファ液間を通して泳動電圧が印加されるようになっており、かつ他端側にキャピラリーカラムが1列に配列された被検出部を備えたものとする。励起・受光光学系は、励起光をキャピラリーアレイの被検出部の1本のキャピラリーカラムに集光光学系により投光するとともにキャピラリーカラム内を泳動する試料から発生する蛍光を同じ集光光学系により受光する落射光学系と、キャピラリーカラム内を泳動する試料から発生する蛍光をその落射光学系とともに結像する共焦点光学系と、その共焦点光学系による蛍光像からの蛍光を4種類の標識蛍光物質のそれぞれに対応する波長ごとに空間的に4つに分

割する分割・分光光学系と、その4分割された蛍光をそれぞれ検出する光電子増倍管又はアバランシェ・フォトダイオードからなる光検出器とを備えたものとする。さらに、キャピラリーアレイの被検出部で全てのキャピラリーカラムからの蛍光を検出するために、励起・受光光学系を被検出部でのキャピラリーアレイの面に平行で泳動方向と直交する一直線に沿って往復方向に移動させる走査機構を備える。

【0012】4種類の蛍光物質を用いてDNAフラグメントを標識するので、信頼性が高くなる。励起・受光光学系が落射光学系と共焦点光学系を備えたものとしたことにより、構成が簡単になり、励起・受光光学系の走査速度を高めることができる。それにより、走査幅が広がってマルチキャピラリーアレイ泳動部の被検出部に配置できるキャピラリーカラムの本数、すなわち同時に泳動させるキャピラリーカラム本数を増やすことができる。高速走査を行なった場合は光検出器の応答速度や感度が問題となるが、光検出器として光電子増倍管やアバランシェ・フォトダイオードを用いることにより、CCDやCIDの撮像素子に比べて応答速度も感度も高く、高速走査に対応することができる。その結果として、キャピラリーカラムの外径にもよるが、500本程度のキャピラリーアレイを用いた4色蛍光同時検出が可能になり、1回の塩基配列読取数が大幅に向上する。

【0013】

【発明の実施の形態】励起・受光光学系の分割・分光光学系の好ましい第1の局面は、共焦点光学系による蛍光像からの蛍光を4つの光束に分割するレンズ系と、分割された光束のそれぞれの光路上に配置された各標識蛍光物質用の異なる4つの蛍光用分光フィルターとを備えたものである。

【0014】励起・受光光学系の分割・分光光学系の好ましい第2の局面は、共焦点光学系による蛍光像からの蛍光を分光する分散素子と、その分散素子により分光された標識蛍光物質のそれぞれに対応する4つの波長の蛍光を光検出器のそれぞれに導く光学系とを備えたものである。

【0015】本発明では、さらに、多数のキャピラリーカラムへの試料注入から泳動までを自動化することが好ましい。そのための好ましい局面では、マルチキャピラリーアレイ泳動部の試料注入側では二次元的に配列されたキャピラリーカラム端が下向きに固定され、そのキャピラリーカラム端の下方にはそのキャピラリーカラム端の配列と対応して、試料が収容された試料容器が二次元的に配列されて各キャピラリーカラムに電圧が印加される試料注入用リザーバ、及び泳動用バッファ液が収容されて全キャピラリーカラムに電圧が印加される泳動用リザーバが配置され、両リザーバのいずれかをキャピラリーカラム端の下方に位置決めするための水平方向の移動と、リザーバをキャピラリーカラム端方向に接近させた

引き離したりするための垂直方向の移動とを行なうリザーバ移動機構を備えている。

【0016】試料注入用リザーバと泳動用リザーバをリザーバ移動機構で切り換えてキャピラリーカラム端と接触させるようにすることによって、キャピラリーカラム端への試料注入も含めた電気泳動操作を自動化することができるようになる。

【0017】本発明では、さらに、泳動中の温度変化による塩基配列決定誤差を防ぐ手段を備えていることが好ましい。そのための好ましい局面では、マルチキャピラリーアレイ泳動部のマルチキャピラリーアレイを収容するチャンバーと、そのチャンバーを一定温度に保つ温調機構とをさらに備えている。キャピラリーアレイを温調することにより、泳動速度の変動に起因するコンプレッションを起こさないような温度条件に制御することができる。

【0018】

【実施例】図1は一実施例を概略的に示す側面断面図である。キャピラリーアレイ2は分離媒体のゲルが充填された複数のキャピラリーカラムが配列されたものであり、その一端側（下端側）2aが試料注入側となってカセットホルダー4により二次元的に配列されて固定されており、試料注入用リザーバの試料又は泳動用の下側リザーバのバッファ液と接触する。キャピラリーアレイ2の他端側（上端側）2bはキャピラリーカラムが一行に配列されており、先端で上側リザーババッファ液と接触する。キャピラリーアレイ2のその他端側にはキャピラリーカラムが一行に配列されてカセットホルダー6により支持されている被検出部2cが設けられている。キャピラリーアレイ2、キャピラリーカラムの下端側を二次元的に配列するためのカセットホルダー4、及び被検出部2cでキャピラリーカラムを一行に配列するためのカセットホルダー6は図2に詳細に示されている。

【0019】キャピラリーカラムは、石英ガラスやホウケイ酸ガラス（例えばバイレックス）等を材質とするものであり、外形が200～300 $\mu$ m、内径が75～100 $\mu$ mのものである。キャピラリーカラムはその外周をSiO<sub>2</sub>など、紫外領域から近赤外領域の励起光によっては蛍光を発生しないか、発生しても蛍光測定妨げにならない程度である無蛍光材質の被膜により被覆されたものが好ましい。その場合には、被検出部2cでも被膜を除去する必要がない。それに対し、キャピラリーカラムが被膜として蛍光を発する樹脂被膜をもったものである場合は、被検出部2cではその被膜を除去しておく。キャピラリーアレイ2にはそのようなキャピラリーカラムが96～480本配列されている。

【0020】キャピラリーカラム内には分離媒体のゲルとして、ポリアクリルアミドゲル、リニアアクリルアミドゲル、ポリエチレンオキサイド（PEO）ゲルなどが充填されている。各キャピラリーカラムには末端塩基別

に異なる蛍光物質FAM、JOE、TAMRA、ROX、R6G、R-110などの蛍光物質から選ばれた4種類の蛍光物質により標識された4種類のDNAフラグメントを含む試料がそれぞれ注入され、同時に電気泳動がなされる。

【0021】標識蛍光物質を励起するための励起光源として、アルゴンガスレーザ装置8が設けられている。アルゴンガスレーザ装置8は出力が40~100mWで、マルチラインタイプであり、488nmや514.5nmなどの波長のレーザ光を同時に発振する。

【0022】励起・受光光学系10は、図3(A)に詳細に示されたものである。14はレーザ装置8からのレーザビーム12を被検出部2cのキャピラリーアレイの面に垂直に照射するミラー、16は中央部に穴をもち、その穴から励起光ビームを透過させ、鏡面で蛍光を反射させるトンネルミラー、18は励起光を1本のキャピラリーカラムに集光して投光するとともに、そのキャピラリーカラムを泳動中の試料から発生する蛍光を受光する集光レンズである。集光レンズ18は励起光の投光と蛍光の受光を同じレンズで行なうものであり、落射光学系を構成している。集光レンズ18で集光された蛍光はトンネルミラー16の鏡面で反射される。

【0023】20はその反射光から励起光成分を遮蔽し、蛍光を透過させる光学フィルター、22は検出視野を限定するためのピンホールスリット、24は光学フィルター20を透過した蛍光をピンホールスリット22の位置に結像させる絞りレンズ24である。キャピラリーカラムでの蛍光発生点がピンホールスリット22の位置に結像されることにより、共焦点光学系を構成している。励起光除去のための光学フィルター20としては、エッジフィルターや色ガラスを利用することができる。ピンホールスリット22は検出視野を小さくして隣接するキャピラリーカラムからの迷光侵入を防ぐためのものである。

【0024】ピンホールスリット22での蛍光像を4つの光束に分割するために、図3(B)に詳細に示されるレンズパネル26が配置されている。レンズパネル24は単レンズをカットして張りあわせたものや、ガラスモールド成形品として製作することができる。その4つに分割された光束のそれぞれの光路上には図3(C)に詳細に示される各標識蛍光物質用の異なる分光用フィルターからなるフィルターパネル28が配置されている。フィルターパネル28はバンドパスフィルターであり、各標識蛍光物質に対応した4種類の波長特性の異なるフィルターがそれぞれの光路上にくるように並列配置されたものである。各フィルターの透過波長は、塩基A、G、C、Tを標識している蛍光物質の発光波長に対応したものである。それぞれのフィルターを透過した蛍光を検出するために、それぞれの光路上には4つの光電子増倍管30が配置されている。

【0025】ミラー14、トンネルミラー16、集光レンズ18、光学フィルター20、ピンホールスリット22、絞りレンズ24、レンズパネル26、フィルターパネル28及び光電子増倍管30を含む励起・受光光学系は、走査機構32のステージに取りつけられており、被検出部2cでの全てのキャピラリーカラムからの蛍光を検出するために、被検出部2cでのキャピラリーアレイの面に平行で、泳動方向と直交する一直線(図1では紙面垂直方向、図3(A)では上下方向)に沿って往復方向に移動させられるようになっている。レーザビーム12がミラー14に入射する方向は、この励起・受光光学系の走査方向と平行になるように設定されており、励起・受光光学系の走査によってもレーザビーム12の光軸が変動しないようになっている。

【0026】キャピラリーアレイ2を一定温度に保つために、図4に示されるように、発泡ポリウレタンなどの断熱材40で囲まれた泳動チャンバー42が設けられ、キャピラリーアレイ2はその泳動チャンバー42内に収容されている。泳動チャンバー42にはベルチェ素子44が設けられて電子加熱冷却が行なわれるようになっている。46、48はベルチェ素子の内側と外側のファンである。泳動チャンバー42内には温度センサーとして白金抵抗体や熱電対が設けられており、その温度センサーの検出出力をベルチェ素子44にフィードバックしてPID制御することにより、泳動チャンバー42内を一定温度に保つようになっている。

【0027】泳動チャンバー42のカバー50は、図5(A)に示されるように、上端の丁番52を中心として開閉できるようになっている。カバー50には上側電極54が取り付けられており、図5(B)に示されるように、カバー50を被せた状態で上側電極54が上側リザーバ56のバッファ液に接触する。上側リザーバ56のバッファ液にはキャピラリーアレイ2の上端2bが浸されている。図1に示されるように、泳動チャンバー42の下側には下側電極58が取り付けられており、試料注入用リザーバ又は泳動用の下側リザーバのバッファ液がキャピラリーアレイ2の下端2aに接触する位置まで押し上げられたときに、下側電極58がその下側のリザーバ内のバッファ液に接触してキャピラリーアレイ2の下端2aと導通するようになっている。両電極54、58を通して電源及び制御ボックス60の高圧電源装置から両リザーバのバッファ液間に試料注入用電圧又は泳動電圧が印加される。その電源電圧は例えば30kVで、電流容量は10~30mAである。

【0028】図6は下側に配置される2つのリザーバ62、64を示したものであり、泳動用リザーバ62と試料注入用リザーバ64が水平面内に並べて、X-Zサンプルステージ68上に支持されている。X-Zサンプルステージ68は、いずれかのリザーバ62、64をキャピラリーアレイ2の下端2aの下方に位置決めする水平

方向(X方向:図1では紙面垂直方向)の移動と、リザーバ内のバッファ液をキャピラリーレイ2の下端2aに接触させたり、下端2aから引き離したりするための垂直方向(Z方向:図1では上下方向)の移動を行なう。

【0029】リザーバ62, 64にはバッファ液が収容され、リザーバ64にはキャピラリーレイ2の下端2aのキャピラリー端の配列に対応したウエルが形成されたサンプルタイタープレート66が乗せられる。サンプルタイタープレート66はウエルの底が貫通し、その貫通した底にはメンブレンが張られ、それぞれのウエルのメンブレン上には試料が吸着されている。リザーバ64中のバッファ液がメンブレンと接触し、バッファ液を通して下側電極58からキャピラリーレイ2の下端2aのキャピラリー端に試料注入用の電圧が印加される。両リザーバ62, 64には下側電極用スペース68, 70が設けられており、そのスペースに下側電極58が入ったときに下側電極58がリザーバ内のバッファ液と接触する。

【0030】サンプルタイタープレート66は貫通したウエルの底に試料を吸着させたメンブレンを設けたもののほか、底をもつウエルに試料を入れ、各ウエルに泳動電圧が印加されるようにしたものでもよい。その場合にはリザーバ64にはバッファ液を入れる必要はなく、ウエルの試料がキャピラリーレイ2の下端2aと接触するまでサンプルタイタープレート66が押し上げられたとき、下側電極58がウエルの電極と接触できるようにしておけばよい。

【0031】電源及び制御ボックス60は、試料注入及び泳動用の高圧電源のほか、レーザ装置の電源装置や制御基板を備えている。その制御基板は、図7に示されるように、CPU80、光電子増倍管30からの検出信号をデジタル信号に変換してCPU80に取り込むA/D変換器82、CPU80からの指示により各部と信号の授受を行なうI/Oインターフェース84、及び泳動チャンバー42の温度制御を行なう温度コントローラ86を備えている。I/Oインターフェース84は、温度コントローラ86、試料注入用及び泳動用の高圧電源、走査機構32のセンサー及びモータ、X-Zサンプルステージ68のセンサー及びモータ、レーザ装置の電源、インターロック用安全スイッチ、表示灯などと接続されている。CPU80は外部のパーソナルコンピュータ88と接続され、パーソナルコンピュータ88でデータ処理が行なわれる。

【0032】次に、この実施例の動作について説明する。試料はサンガー反応を用いて調製されたDNA断片試料であり、末端塩基の種類に応じてプライマー又はターミネータが異なる蛍光物質で標識されている。その試料はサンプルタイタープレート66に用意する。

【0033】キャピラリーレイ2の各キャピラリーカ

ラムにはアクリルアミドモノマー溶液又はロングレンジャー(アクリルアミドを主成分とするゲル原料で、アメリカFMC社の商品名)モノマー溶液を電気泳動ゲル組成に調製したものを真空ポンプやアスピレーターを用いて負圧吸引し、ゲル重合させる。キャピラリーレイ2をカセットホルダー4, 6により図1の泳動装置の所定の位置に装着する。

【0034】上下のリザーバ56, 62, 64にバッファ液を入れて泳動装置に装着し、試料を入れたサンプルタイタープレート66は下側リザーバ64に装着して試料とバッファ液とを接触させる。

【0035】その後、パーソナルコンピュータ88からシーケンス開始が入力されると、サンプルステージ68がサンプルタイタープレート66をキャピラリーレイ端2aの下方に移動させ、サンプルタイタープレート66を上昇させてキャピラリーレイ端2aをサンプルタイタープレート66中の試料に接触させる。その後、両電極54, 58間に高圧が所定時間印加されて試料の注入が行なわれる。

【0036】試料注入後、サンプルステージ68が作動し、泳動用リザーバ62がキャピラリーレイ端2aの位置に位置決めされてキャピラリーレイ端2aが泳動用バッファ液に浸された後、両電極54, 58間に高電圧が印加されて泳動が開始される。泳動中はコンプレッションを起こさないように泳動チャンバー42内を40~60℃の一定温度になるように制御される。

【0037】泳動分離されたDN断片が検出部2cを通過する際、励起・受光光学系10が走査されて試料を標識している蛍光物質からの蛍光が検出される。このとき、フィルターパネル28の4つのフィルターを通過して4つの光電子増倍管30で検出された蛍光による信号の強度比により、その蛍光標識が判別されて塩基が同定される。励起・受光光学系10の走査速度は、250~500mm/秒で、1回の走査を1秒以下で行なうのが好ましい。

【0038】キャピラリーレイ2の各々のキャピラリーカラムの同定は、走査機構32にエンコーダを設けておき、そのエンコーダから得られる出力パルスを用いて行なうことができる。そのようにして求められたキャピラリーカラム位置と蛍光信号が対比させられる。各キャピラリーカラムごとの信号が波形処理され、移動度補正などの補正処理が行なわれて各キャピラリーカラムごとの塩基配列が決定される。移動度補正は標識蛍光物質の分子量の違いにより泳動移動度が若干異なることがあるため、それを補正する処理である。

【0039】この実施例では各リザーバにバッファ液を入れて泳動装置に装着する用にしているが、各リザーバを予め泳動装置に設置しておき、ノズルやポートを介してバッファ液を各リザーバに自動的に注入したり排出したりする送・排液手段を泳動装置に設けて、バッファ液



の入れ換えの自動化を図るようにしてもよい。

【0040】図8は励起光源のレーザ装置8からの励起光ビームが励起・受光光学系10の走査によってもずれないようにするための他の実施例を示したものである。ここでは、レーザ装置8からのレーザビームがカップラー90により結合された光ファイバ92を経てコリメータ94から図3に示されたトンネルミラー16に入射される。コリメータ94は走査される励起・受光光学系10に固定されている。図8の実施例では、レーザ装置8の方向を厳密に設定しなくても、励起光ビームが励起・受光光学系10の走査によってずれることはない。

【0041】図9は励起・受光光学系10における分割・分光光学系の他の実施例を示したものである。図3の実施例ではピンホールスリット22に結像した蛍光を4つに分割した後に分光するために、レンズパネル26とフィルターパネル28を用いているのに対し、図9の実施例ではピンホールスリット22に結像した蛍光像を凹面グレーティング96で分割と分光を同時に行なっている。98はピンホールスリット22を透過した蛍光を凹面グレーティング96の方向に反射するための平面ミラーである。凹面グレーティング96による分光の結像位置には、4つの標識蛍光物質に対応した波長位置からの蛍光を受光するバンドルファイバ100の一端が配置されており、バンドルファイバ100の他端は4つの光電子増倍管又はアバランシェ・フォトダイオード30に導かれている。

【0042】

【発明の効果】本発明では4種類の蛍光物質を用いてDNAフラグメントを標識するので、信頼性が高くなる。励起・受光光学系が落射光学系と共焦点光学系を備えたものとしたことにより、構成が簡単になり、励起・受光光学系の走査速度を高めることができる。そして、光検出器として応答速度や感度の高い光電子増倍管やアバランシェ・フォトダイオードを用いているので、高速走査に対応することができる。その結果として、同時に泳動させることのできるキャピラリーカラム本数を増やすことができる。試料注入用リザーバと泳動用リザーバをリザーバ移動機構で切り換えてキャピラリーカラム端と接触させるようにすれば、キャピラリーカラム端への試料注入も含めた電気泳動操作を自動化することができるようになる。マルチキャピラリーアレイ泳動部のマルチキャピラリーアレイを収容するチャンバーと、そのチャン

バーを一定温度に保つ温調機構とを備えることにより、泳動速度の変動に起因するコンプレッションを防ぎ、塩基配列決定誤差を防ぐことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】一実施例を概略的に示す側面断面図である。

【図2】キャピラリーアレイとカセットホルダを示す斜視図である。

【図3】(A)は一実施例における励起・受光光学系を示す側面断面図、(B)はそこで用いられるレンズパネルを示す斜視図、(C)はそこで用いられるフィルターパネルを示す斜視図である。

【図4】(A)は温度制御機構を備えた泳動チャンバーを示す正面断面図、(B)は側面断面図である。

【図5】同泳動チャンバーのカバーを示す側面断面図であり、(A)はカバーを開けた状態、(B)は閉じた状態である。

【図6】下側に配置される2つのリザーバを示す図であり、(A)は平面図、(B)は側面図である。

【図7】電源及び制御ボックスに設けられる制御基板を示すブロック図である。

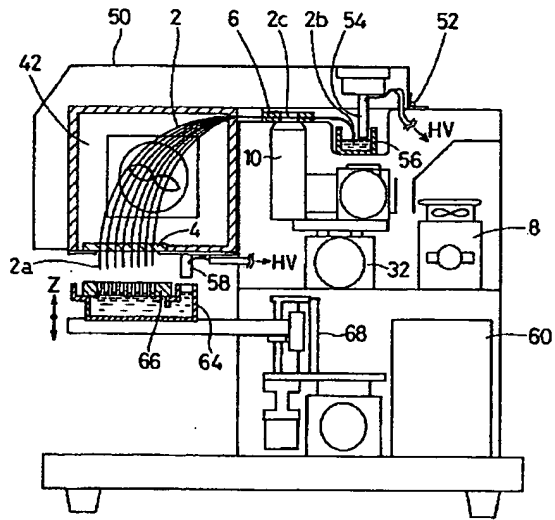
【図8】他の実施例における励起光ビームを供給する機構を示す平面図である。

【図9】さらに他の実施例における励起・受光光学系を示す側面断面図である。

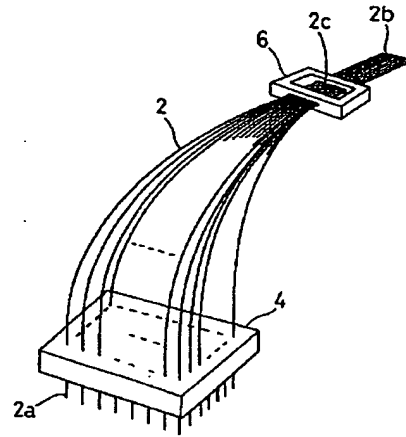
【符号の説明】

2	キャピラリーアレイ
2c	被検出部
8	アルゴンガスレーザ装置
10	励起・受光光学系
12	レーザビーム
18	集光レンズ
22	ピンホールスリット
24	絞りレンズ
26	レンズパネル
28	フィルターパネル
30	光電子増倍管
42	泳動チャンバー
44	ヘルチェ素子
56, 62, 64	リザーバ
66	サンプルタイタープレート
68	X-Zサンプルステージ

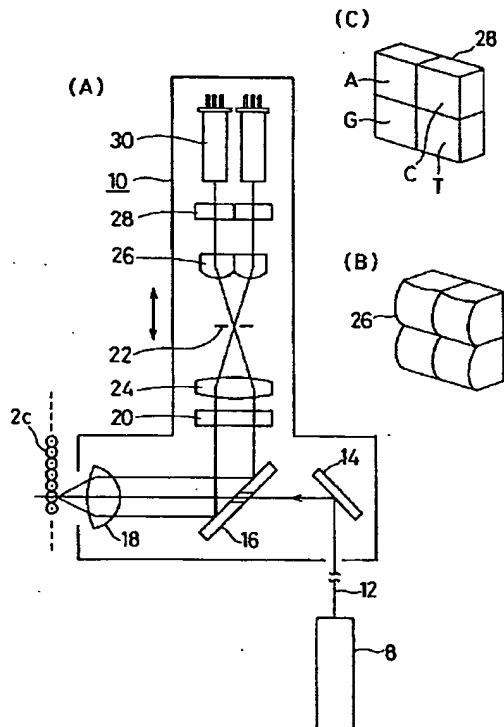
【図1】



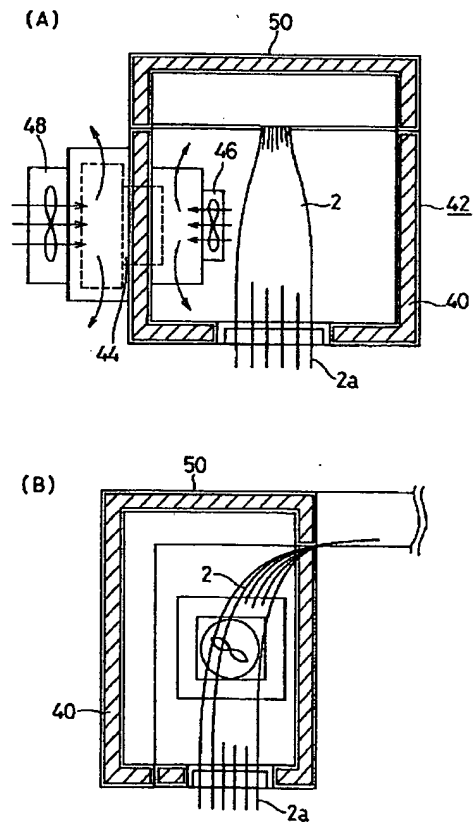
【図2】



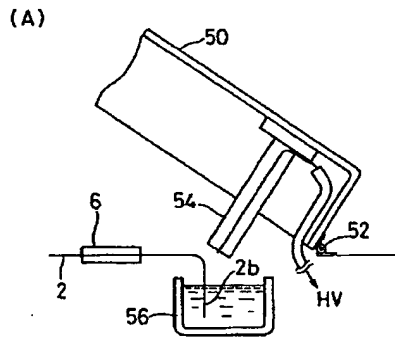
【図3】



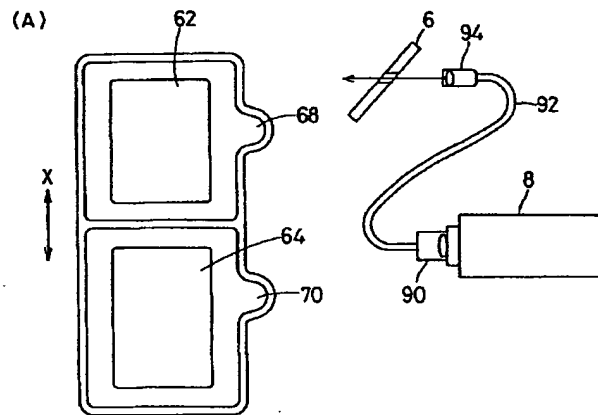
【図4】



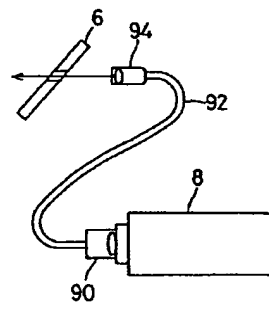
【図5】



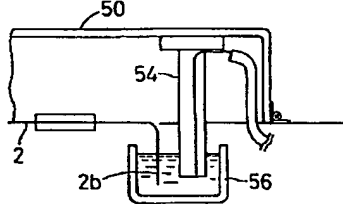
【図6】



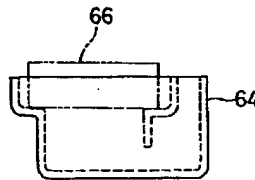
【図8】



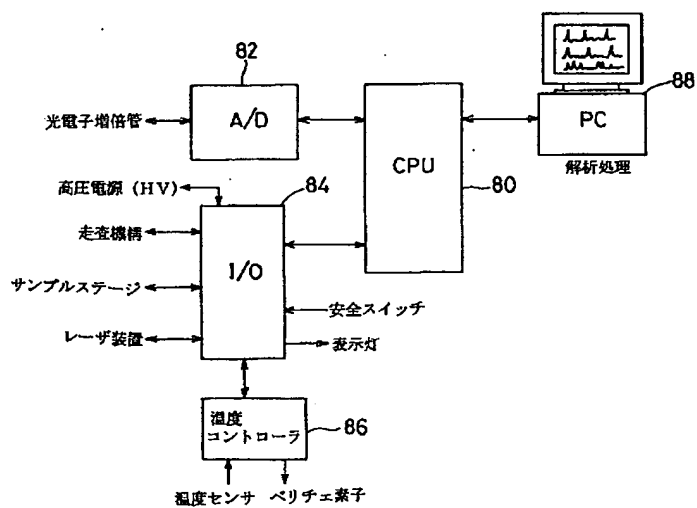
(B)



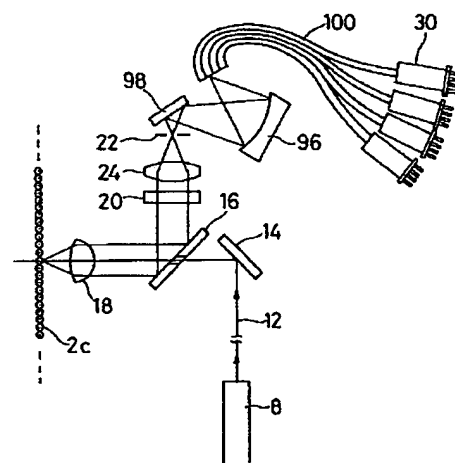
(B)



【図7】



【図9】



フロントページの続き

(72)発明者 林崎 良英

茨城県つくば市高野台3丁目1番1 理化学研究所 ライフサイエンス筑波研究センター内

(72)発明者 中村 伸

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地  
株式会社島津製作所三条工場内